莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白的多克隆抗体制备及应用

刘雁霞[1]，樊振川[1]

天津科技大学大健康生物技术研究所，天津市大健康生物技术国际联合研究中心，天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300457

摘要 [目的] 亮氨酸拉链转录因子 1（LZTFL1）是一种与纤毛信号传导相关的蛋白，关于其如何在信号传导中发挥作用以及作用机理目前尚不清楚。莱茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）是研究纤毛信号传导的模式生物，而目前对莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白的研究甚少，尚未有相应的检测抗体，因此制备 LZTFL1 多克隆抗体用于后续实验研究。[方法] 采用 RT-PCR 技术从 *C. reinhardtii* CC125 中提取总 RNA，扩增 981 bp 的目的基因 *Lztfl1*，插入到 pET-28a(+)原核表达载体，成功构建 pET-28a(+)-*Lztfl1* 重组质粒，转入 *E.coli* BL21（DE3）经 IPTG 诱导后成功表达 6×His-LZTFL1 融合蛋白，融合蛋白经亲和纯化后免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体，最后采用间接 ELISA 法测得抗血清效价达到 1:512 000，经 Western blot 对 *C. reinhardtii* CC125 检测具有较高特异性。[结果]首次实现了莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白的原核表达，制备出一支兔抗莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白的多克隆抗体，为后续研究 LZTFL1 蛋白在莱茵衣藻中的结构功能及在纤毛信号传导中的相互作用奠定了基础。

关键词：莱茵衣藻；LZTFL1；蛋白纯化；多克隆抗体；免疫荧光

莱茵衣藻（*C. reinhardtii*）是一种结构简单的单细胞真核藻类，是目前国内外研究纤毛结构、组装及功能的主要模式生物之一[1]。纤毛根据其运动状态分为运动纤毛和原生纤毛，运动纤毛是由“9+2”型微管蛋白骨架形成的从细胞基体部位伸出的较长细胞突起，原生纤毛由“9+0”型微管蛋白骨架形成，通常所研究纤毛都为运动纤毛。纤毛具有协调细胞生长和进行细胞信号传导的作用，纤毛缺失或信号传导功能障碍会造成一系列的疾病，目前已发现许多纤毛基因的缺失或突变导致一系列纤毛病，如肾囊肿，肝脏纤维化，视网膜变性，先天性心脏病，肥胖等都与纤毛缺陷有关，而由纤毛缺陷引起的人类疾病数量正在迅速增长[2]。因此了解纤毛的功能、组装原理及信号通路可以为纤毛病的诊断和治疗提供分子依据。从 20 世纪 90 年代以来，人们对纤毛的研究逐步加深，从纤毛结构的研究到纤毛组装、功能、纤毛蛋白间的相互作用、纤毛信号传导及纤毛与疾病间的关系均取得了一定进展。已知纤毛内存在一种 BBSome 复合物，BBSome 依赖于纤毛内运输机制（IFT）由 IFT 蛋白携带运送

Supported by: International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) Collaborative Research Program (CRP) (CRP/CHN15-01).
Corresponding author: Zhen-Chuan Fan. Tel: +86-22-60912419; Fax: +86-22-60912419; E-mail: fanzhen@tust.edu.cn
国际遗传工程与生物技术中心联合研究项目 (No.CRP/CHN15-01)资助。

至纤毛顶端，参与完成纤毛的组装，BBSome 的基因突变或基因缺失也会引起一系列纤毛类疾病，这种由 BBSome 引起的各类疾病，统称为“巴德-毕氏综合征（Bardet-Biedl syndrome，BBS）”，其典型症状为肥胖，精神紊乱，失明等[3]。另有研究表明，IFT27 功能一旦缺失会导致纤毛内 BBSome 无法输出，造成 BBSome 在纤毛内的积累，进而引发毕氏综合征，由此可见，IFT 蛋白与 BBSome 之间可能存在直接或间接的联系，目前尚未可知。

在动物实验研究中，亮氨酸拉链转录因子 1（LZTFL1）位于 3 号染色体 3p21.3 区域，与毕氏综合征有密切关系，是迄今为止发现的第 17 个与 BBS 有关的基因，因此又被称为 *BBS17*，*Lztfl1* 基因 5 个碱基的缺失便会引起 BBS[4-11]；*Lztfl1* 基因突变会引发恶性肿瘤，继而发展为癌症，比如肺癌，胃癌等[12, 13]。另外，在人体及小鼠的实验研究中，敲除 *Lztfl1* 基因会导致纤毛内 BBSome 的累积[14-18]，与 *ift* 基因缺陷对 BBSome 造成的影响一致，动物临床表现为小鼠体重增加及引起失明[12]，由此可判断，BBSome，LZTFL1 与 IFT 三种蛋白间存在一定相互作用，Seo. S[15]等人已经证实 LZTFL1 在小鼠体内与 BBS9 直接作用，而与 IFT 蛋白的作用至今没有明确数据证实，有研究者猜测 IFT27 与 BBSome 之间可能是通过 LZTFL1 蛋白连接[14]，从而实现 BBSome 与 IFT 蛋白之间的相互作用。

为进一步研究 BBSome 与 IFT 蛋白的作用方式，验证两者是否通过 LZTFL1 蛋白作为连接桥梁实现间接联系，特制备检测莱茵衣藻内 LZTFL1 蛋白的多克隆抗体，实验以 *C.reinhardtii* CC125 总 RNA 为模板，采用 RT-PCR 技术扩增 *Lztfl1* 基因片段，克隆至原核表达载体 pET-28a (+)，诱导表达融合蛋白 6×His-LZTFL1，并以此纯化产物制备多克隆抗体，为进一步研究 LZTFL1 的生物学功能及其在莱茵衣藻中的蛋白相互作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌株及质粒　克隆表达载体 pET-28a (+)、感受态细胞 *E. coli* XL1-blue、感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3)、*C. reinhardtii* CC125 均由本实验室保存。

1.1.2　实验试剂　限制性内切酶（*Eco*RI/*Xho*I）、T_4 DNA 连接酶及蛋白 Marker 等均购自美国 Thermo 公司；DNA Marker 购自北京全式金公司；质粒小提试剂盒以及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京索来宝科技有限公司；抗体纯化介质（Protein A SepharoseTM CL-4B）及亲和纯化介质（Ni SepharoseTM 6 Fast Flow）购自美国 GE Healthcare 公司；硝酸纤维素膜

（NC 膜）购自美国 PALL 公司；弗式完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司；His-tag 抗体购自碧云天生物技术研究所；HRP 标记的羊抗兔/鼠抗体购自美国 Jackson 公司；荧光标记的羊抗兔二抗，羊抗小鼠二抗购买自美国 Sigma 公司；ECL 化学发光显色液购买自德国 Millipore 公司；其他药品试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验动物　实验用雄性新西兰大白兔 1 只，3~4 月龄，体重 1.5~2.0 kg，由天津欧阳实验种兔场提供。

1.2 实验方法

1.2.1 重组表达质粒 pET-28a (+)-*Lztfl1* 的构建　利用基因库 Phytozome 查找 *Lztfl1* 的 cDNA 序列，长度为 981 bp，设计引物序列如表 1（下划线部分为 *Xho*I 限制性内切酶切位点），由北京奥科鼎盛生物有限公司合成。*Lztfl1* cDNA 全基因序列来源于 *C. reinhardtii* CC125，通过 Trizol 法提取莱茵衣藻总 RNA，反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板，分别以上游引物、下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：95℃预变性 5 min；95℃变性 45 s，52℃退火 45 s，72℃延伸 2 min，共 30 个循环；72℃终延伸 10 min。将纯化后的 PCR 产物及表达载体 pET-28a (+)用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切，分别回收大小为 981 bp 的 PCR 产物目的片段和 5 344 bp 的载体片段，利用 T_4 DNA 连接酶进行 4℃过夜连接，同时设置不含目的片段的对照组；将连接产物及对照组转化至感受态细胞 *E. coli* XL1-blue，在含有卡纳抗生素（100 μg/ml）的 LB 平板上 37℃过夜培养 14-16 h；挑取阳性克隆继续培养过夜，提取质粒，进行 *Eco*RI/*Xho*I 双酶切验证，将验证结果为阳性的质粒进行测序。

表 1　***Lztfl* PCR** 扩增引物

Table 1　Primers of *Lztfl1*

Primer name	Primer sequence (5′–3′)
Forward	CCGAATTCATGTCAATACAACTC
Reverse	GGCTCGAGCTAGGCGGTGTCTGC

1.2.2 融合蛋白 6×His-LZTFL1 诱导表达　将测序正确的重组质粒 pET-28a(+)-*Lztfl1* 进行诱导表达，诱导方法参照文献中报道[18]，设定诱导温度为 25℃，IPTG 浓度为 0.2 mmol/L。经 4℃，6000 g 离心 15 min，收集菌体，加入裂解液/结合液（20 mmol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑，pH=7.4）将菌体重悬（20 ml 裂解液重悬 200 ml 菌体），超声破碎细胞，获得全蛋白；分别收集部分全蛋白，上清和沉淀，进行 12% SDS-PAGE 电泳，鉴定表达融合蛋白存在于上清或沉淀[19]；同时采用蛋白免疫印迹方法鉴定所诱导蛋白是否为目的蛋白[20]。

1.2.3 融合蛋白 6×His-LZTFL1 纯化　将诱导表达后的菌体离心收集，加入裂解液/结合

液（20 mmol/L NaH2PO4，0.5 mol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑）超声波破碎，将上清液过0.22 μm滤膜后与1 ml Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 填料4℃结合过夜；收集流穿液，用5倍柱体积的洗涤缓冲液（同结合液）洗涤，去杂蛋白；再用和柱体积相同的洗脱缓冲液（20 mmol/L NaH2PO4，0.5 mol/L NaCl，60 mmol/L 咪唑，pH=7.4）依次洗脱5次。将纯化后的融合蛋白冻干，经PBS溶解为1 mg/ml，存-80℃备用。

1.2.4 动物免疫实验 首次免疫，取1 ml融合蛋白与1 ml弗氏完全佐剂完全混合，采用颈背部多点皮下注射法免疫新西兰大白兔，免疫前，经兔耳动脉采血100 μl作为阴性对照血清。每隔10天加强1次免疫，共加强免疫4次，加强免疫取1 ml融合蛋白与1 ml弗氏不完全佐剂混合，免疫剂量及途径同初免。末次免疫一周后，经耳动脉采血100 μl[21]，分离血清，间接ELISA法测定抗血清效价。将效价合格的家兔经股动脉采血，分离血清，于-80℃冻存。

1.2.5 多克隆抗体效价的测定 采用间接ELISA法测定抗体效价[18]，将纯化后的融合蛋白4 ℃包被过夜，用5%的脱脂乳粉封闭；一抗为按照1:1 000，1:2 000，1:4 000，1:8 000，1:16 000，1:32 000，1:64 000，1:128 000，1:256 000，1:512 000稀释的抗血清及阴性对照血清；二抗为HPR标记的羊抗兔抗体IgG（1:20 000稀释），用TMB显色，酶标仪测定450 nm处吸光度值。若试验组抗血清OD_{450}/阴性对照组抗血清$OD_{450}\geq 2.1$判为阳性，则其最高稀释度便为抗血清的效价。

1.2.6 多克隆抗体纯化及检测 采用纯化介质Protein A SepharoseTM CL-4B纯化抗血清[19]，将纯化后的抗血清稀释至1mg/ml后，置-80℃保存。

采用Western blot法检测抗体特异性，取20 μg经过蛋白定量处理的莱茵衣藻上清蛋白，加入上样缓冲液后，进行12% SDS-PAGE电泳，电转至NC膜，封闭后以1:400的稀释比孵育多克隆抗体，二抗采用HRP标记的羊抗兔IgG（1:10 000稀释），进行ECL显色。

1.2.7 莱茵衣藻中LZTFL1蛋白的定位 分别取对数期生长的野生型藻种CC-125和在*LZTFL1*基因C端添加GFP标签的转基因藻种进行双重验证，转基因藻种通过莱茵衣藻电转化法[17]获得，将质粒Lztfl1::GFP::Paro转入野生型藻种CC125核基因组，通过抗性标记筛选阳性克隆，通过Western blot验证阳性克隆。

采用免疫荧光技术对莱茵衣藻内LZTFL1蛋白进行定位分析，固定制片后，于室温下利用牛血清白蛋白（BSA）封闭1 h，分别采用纯化后的LZTFL1多克隆抗体（1:10

稀释比）和商业化 GFP 抗体（1:10 稀释比）室温孵育 4 h，采用荧光标记羊抗兔/小鼠二抗室温孵育 1 h，封片后在荧光显微镜下拍照。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET-28a (+)-*Lztfl1* 的构建

通过 RT-PCR 扩增获得 981 bp 的 *Lztfl1* 基因，连接至载体后，转化挑取单克隆提质粒并酶切验证。图 1 显示 *C. reinhardtii* CC125 总 RNA 提取结果；图 2A 显示 PCR 扩增产物，条带单一且大小正确；图 2B 显示重组表达质粒 pET-28a (+)-*Lztfl1* 阳性克隆双酶切验证结果，验证大小与预期结果一致，经测序验证结果正确，说明表达载体 pET-28a(+)-*Lztfl1* 构建成功。

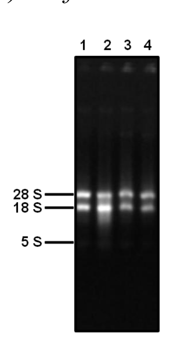


图 1　*C. reinhardtii* CC125 总 RNA 的提取

Fig. 1　Total RNA extract of *Cr*. CC125. 1~4: The different tube of the total RNA.

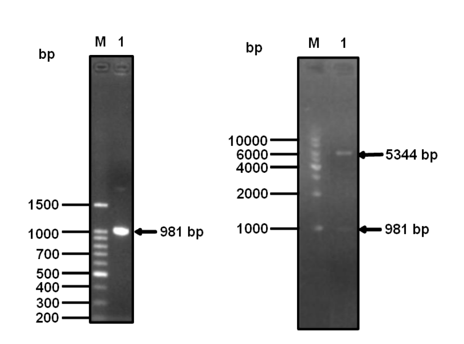


图 2　*Lztfl1* PCR 扩增及重组质粒双酶切

Fig. 2　PCR amplification of *Lztfl1* and identification of recombinant expression plasmid by restriction enzyme digestion. (A) PCR verification of *Lztfl1* gene. M: 100 bp DNA Marker; 1: PCR product of *Lztfl1* gene. (B) Restriction digestion analysis of pET-28a(+)-*Lztfl1*. M: 1 kb marker; 1: pET-28a(+)-*Lztfl1* digested with *Eco*RI and *Xho*I.

2.2 融合蛋白 6×His-LZTFL1 诱导表达及纯化

融合蛋白 6×His-LZTFL1 由 DNAMan 预测大小约 38 kDa，添加 IPTG 诱导后，经 SDS-PAGE 分析显示（图 3A），在 35 kDa 有明亮条带，且融合蛋白大多存在于上清中；进一步经蛋白免疫印迹用 His-tag 抗体检测证实该蛋白确定为目标蛋白（图 3B）；将纯化后的蛋白冻干溶于 PBS 中，纯度可达 90%以上，可作为免疫抗原（图 4）。

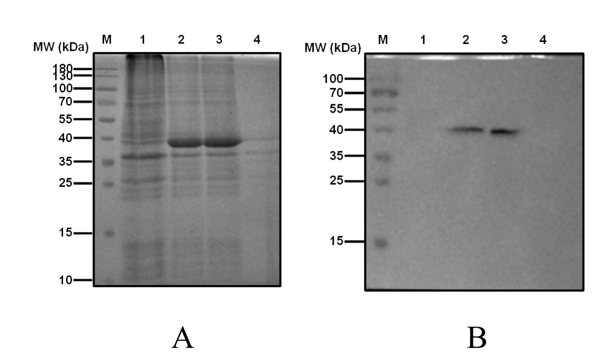


图 3　SDS-PAGE 及蛋白免疫印迹检测重组蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

Fig. 3　SDS-PAGE and western blot analysis of the expression of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3). (A) Expression of the recombinant protein 6×His-LZTFL1. M: protein marker; 1: the total protein of BL21 lysates with

6×His-LZTFL1 before induced; 2: the total protein of BL21 lysates with 6×His-LZTFL1 after induced; 2: the supernatant of BL21 lysates with 6×His-LZTFL1 before induced; 3: the sediment of BL21 lysates with 6×His-LZTFL1. (B) Western blot analysis with anti-His-tag. The lane isas same as (A).

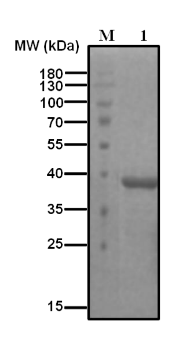


图 4　SDS-PAGE 分析纯化产物

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of the purified 6×His-LZTFL1 recombinant protein by affinity purification. M: protein marker; 1: purified　6×His-LZTFL1 recombinant protein.

2.3　抗体的效价及特异性检测

抗血清检测参照纤毛内运输蛋白 IFT46 抗体制备方法[19]，采用间接 ELISA 法测定，抗血清滴定度达到 1:512 000（图 5），Western blot 分析显示，纯化后的抗血清在 35 kDa 处可见特异性结合条带，由此可知抗血清可与莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白发生特异性结合（图 6），表明所制备的多克隆抗体特异性良好。

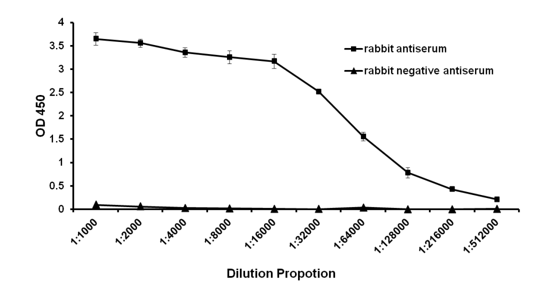


图 5　间接 ELISA 法测定抗血清效价

Fig. 5　Determination of anti-LZTFL1 polyclonal antiserum by indirect ELISA.

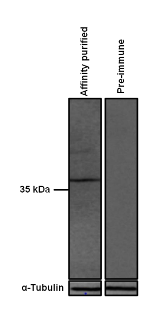


图 6　免疫印迹法验证抗血清特异性

Fig. 6 The specificity and sensitivity of LZTFL1 anti-serum against C. reinhardtii by western blot. The wide-type C. reinhardtii CC125 was probed with affinity purified anti-LZTFL1, in contrast, the pre-immune werum with no specific band.　α -Tubulin as the internal reference.

2.4　LZTFL1 蛋白在莱茵衣藻中的定位

采用电转化法获得 LZTFL1-GFP 转基因藻种，转化效率可达 10%，利用 GFP 抗体通过 Western blot 初筛有信号的阳性克隆，融合蛋白大小约 62 kD，从信号克隆中复筛高表达量藻种，利用表达量最高的藻种进行免疫荧光实验，图 7a 为野生型藻种 CC125 与转基因藻种 LZTFL1-GFP 考马斯亮蓝染色，作为上样对照；图 7b 为利用 GFP 抗体检测结果。

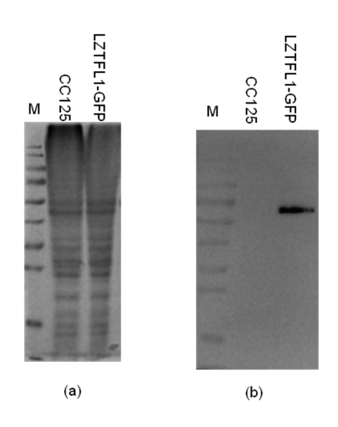
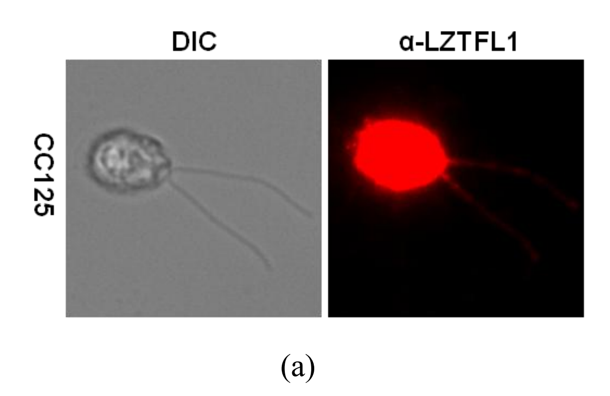
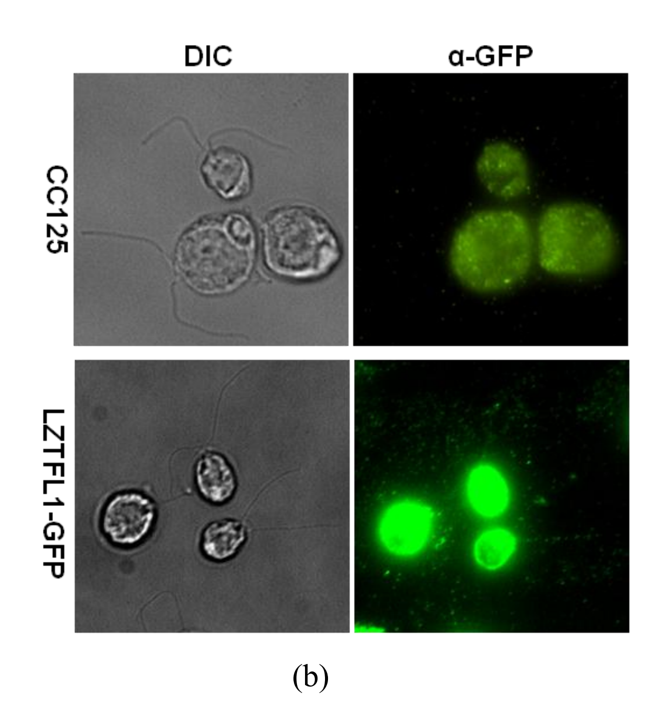


图 7　LZTFL1-GFP 转基因藻种筛选

通过免疫荧光技术对莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白进行定位分析，图 8，可通过荧光信号看出多克隆抗体可以与莱茵衣藻内的 LZTFL1 蛋白进行特异性结合，且该蛋白可以进入莱茵衣藻纤毛内，该蛋白在细胞和纤毛中均有分布，图 8a 显示野生型藻种中 LZTFL1 蛋白在纤毛中有红色荧光信号；图 8b 显示在转基因藻种中利用 GFP 抗体可检测到纤毛内的绿色荧光信号。



(a)



(b)

图 8　免疫荧光检测 LZTFL1 蛋白在莱茵衣藻纤毛中的定位

Fig. 8 Immunofluorescence analysis the flagella localization of LZTFL1. (a) The polyclonal antibody of LZTFL1 as the primary antibody, it showed that LZTFL1 is localized along the flagella. (b) The antibody of GFP as the primary antibody, it showed that LZTFL1 is localized along the flagella as punctuated dots.

3　讨论

抗体是研究蛋白之间相互作用及共定位的必备工具，而使用原核生物制备多克隆抗体是实验室获得所需抗体的常用手段之一。本实验室常用的原核表达载体主要有 pET、pMAL、pGEX 三大系列载体，pET 系列载体含有 6 个组氨酸编码序列，可与外源蛋白融合表达后带有 6 个组氨酸的纯化标签，整个标签大小约为 4.3 kDa，一般不会影响蛋白的结构和功能；另外，通过

组氨酸与金属离子（Ni^{2+}）的螯合作用，对表达蛋白进行亲和纯化的方法体系日渐完善，因此本次实验优先选择 pET-28a(+)作为表达载体。

在诱导表达过程中，认为对温度以及 IPTG 浓度的控制是诱导能否成功的关键所在。高温诱导融合蛋白虽然表达量较高，但易于形成包涵体，变性后的蛋白由于其空间结构破坏，产生的抗体不利于后期实验研究，如免疫荧光。本次试验 6×His-LZTFL1 融合蛋白经诱导后主要存在于上清蛋白中，所制备的抗体不仅可用于 Western blot，同时也可用于免疫荧光实验。由于目前没有 LZTFL1 蛋白抗体制备的报道，本实验室首次得到该抗体，为后期对莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白在纤毛信号传导中所发挥的作用研究奠定了基础。

另外在免疫荧光实验中，利用 LZTFL1 多克隆抗体得到的结果不及利用 GFP 抗体在转基因藻种上得到的效果明显，一方面可能由于制备的多克隆抗体相对于商业化的 GFP 抗体较差；其次可能由于转基因藻种存在基因过表达现象，以及利用抗体将信号放大，从而使得检测效果较为明显。

参考文献

[1] Merchant Sabeeha S, Prochnik Simon E, Vallon Olivier, et al. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions[J]. Science (New York, N.Y.), 2007, 318 (5848):245~250.

[2] Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, et al. The ciliopathies: an emerging class of human disorders. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006, 7:125-148.

[3] Aldahmesh MA, Li Y, Alhashem A, et al. IFT27, encoding a small GTPase component of IFT particles, is mutated in a consanguineous family with Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet, 2014, 23 (12):3307-3315.

[4] Schaefer E, Lauer J, Durand M, et al. Mesoaxial polydactyly is a major feature in Bardet-Biedl syndrome patients with LZTFL1 (BBS17) mutations. Clin Genet, 2014, 85 (5):476-481.

[5] Forsythe E and Beales P L. Bardet-Biedl syndrome. Eur J Hum Genet, 2013, 21 (1):8-13.

[6] Marion V, Stutzmann F, Gerard M, et al. Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothened trafficking regulator, in a family with Bardet--Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. J Med Genet, 2012, 49 (5):317-321.

[7] Marion V, Mockel A, De Melo C, et al. BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. Cell Metab, 2012, 16 (3):363-377.

[8] Zhang Q, Nishimura D, Seo S, et al. Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108 (51):20678-20683.

[9] Yen HJ, Tayeh MK, Mullins RF, et al. Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. Hum Mol Genet, 2006, 15 (5):667-677.

[10] Mykytyn K, Mullins RF, M Andrews, et al. Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (23):8664-8669.

[11] Kim JC, Badano JL, Sibold S, et al. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. Nat Genet, 2004, 36 (5):462-470.

[12] Jiang J, Promchan K, Jiang H, et al. Depletion of BBS Protein LZTFL1 Affects Growth and Causes

Retinal Degeneration in Mice. J Genet Genomics, 2016, 43 (6):381-391.
[13] Kiss H, Kedra D, Kiss C, et al. The LZTFL1 gene is a part of a transcriptional map covering 250 kb within the common eliminated region 1 (C3CER1) in 3p21.3. Genomics, 2001, 73 (1):10-19.
[14] Eguether T, San Agustin JT, Keady BT, et al. IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. Dev Cell, 2014, 31 (3):279-290.
[15] Seo S, Zhang Q, Bugge K, et al. A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothened. PLoS Genet, 2011, 7 (11):e1002358.
[16] Wang Z, Fan ZC, Williamson SM, et al. Intraflagellar transport (IFT) protein IFT25 is a phosphoprotein component of IFT complex B and physically interacts with IFT27 in Chlamydomonas. PLoS One, 2009, 4 (5):e5384.
[17] Fan ZC and Bird RC. An alternative -1/+2 open reading frame exists within viral N(pro)(1-19) region of bovine viral diarrhea virus SD-1. Virus Res, 2012, 163 (1):341-351.
[18] Dong B, Wu S, Wang J, et al. Prokaryotic expression，purification and polyclonal antibody preparation of the Chlamydomonas Ｒeinhardtii intraflagellar transport protein (IFT27). Biotechnology, 2016, 26(6): 532–538.
董彬，吴淞，王晶，等. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白 IFT27 的原核表达纯化及多克隆抗体制备. 生物技术学报, 2016, 26(6): 532–538.
[19] Ren HY, Dong B, Fan ZC, et al. Prokaryotic expression and purification of Chlamydomonas reinhardtii intraflagellar transport protein 46(IFT46) and preparation of polyclonal antibody. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(8): 1124–1132.
任海月，董彬，樊振川，等. 莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备. 生物工程学报. 2016, 32(8): 1124-1132.
[20] Valcourt U, Gouttenoire J, Aubert-Foucher E, et al. Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF-beta1. FEBS Lett, 2003, 545 (2-3): 115-119.
[21] Tian W, Dona B, Li ZF, et, al. Prokaryotic Expression，Purification and Polyclonal Antibody Preparation of Chlamydomonas reinhardtii IFT139 Protein Antigen. Journal of Tianjin University of Science & Technology. 2016, 31(8): 27-33.
田伟，董彬，李振芳，等. 莱茵衣藻 IFT139 蛋白抗原的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备. 天津科技大学学报. 2016, 31(8): 27-33.

Polyclonal antibody preparation and application of *C.reinhardtii* LZTFL1 protein

LIU Yan-Xia[1] FAN Zhen-Chuan[1]

Institute of Health Biotechnology, International Collaborative Research Center for Health Biotechnology, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Leucine zipper transcription factor 1 (LZTFL1) is a protein associated with cilia signaling, and it is unclear about its function and mechanism in signal transduction. While *Chlamydomonas reinhardtii* as a model organism that studies the signal transmission of cilia, there is little research on the LZTFL1 protein, and no corresponding antibody has been detected. Based on this phenomenon, polyclonal antibody of LZTFL1 was prepared for subsequent study. The aim was to clone

and express *C. reinhardtii Lztfl1* gene in *Escherichia coli* (*E. coli*). In this report the *Lztfl1* gene of *C.reinhardtii* CC125 was amplified by RT-PCR, then was sub-cloned and heterologous expressed in *E.coli* BL21(DE3) using pET-28a (+) expression vector. Fusion protein 6×His-LZTFL1 was purified and immunized into New Zealand white rabbit so as to prepare polyclonal antibody. Finally, the sensitivity and specificity of the polyclonal antibody were detected through indirect ELISA and Western blot, respectively. The anti-LZTFL1 showed high sensitivity (1:512 000) and specificity. The above results indicate that *Lztfl1* gene has been successfully cloned and expressed, and the rabbit anti-*C. reinhardtii* LZTFL1 polyclonal antibody has been prepared, which laid the foundation for the study of the structure and function of LZTFL1 protein in *C. reinhardtii* and its interaction in cilia signal transduction.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii* LZTFL1 Protein affinity purification Polyclonal antibody Immunofluorescence